

PROCÉDÉ D'OBTENTION IN VITRO DE CELLULES INSULINO-
SECRÉTRICES DE MAMMIFERE ET LEURS UTILISATIONS.

5 La présente invention concerne un procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices in vitro, à partir de tissu pancréatique. Elle concerne notamment l'obtention des cellules insulino-sécrétrices à partir des pancréas de patients atteints de pathologies pancréatiques
10 et particulièrement de diabète. Elle concerne également l'utilisation de ces cellules pour des préparations destinées au traitement thérapeutique du diabète.

15 La thérapie cellulaire offre aujourd'hui d'importantes perspectives dans le traitement du diabète (Shapiro AM et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes Mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen N Engl J Med 343:230-238, 2000) Le concept du traitement du diabète par la transplantation ectopique de cellules insulino-sécrétrices a déjà été validé. Au cours d'une pancréatectomie totale, l'isolement et la greffe intraportal des îlots endocrines du pancréas permettent de maintenir une sécrétion endogène, presque physiologique, d'insuline et le maintien de l'homéostase glucidique pendant plus de dix ans (Pyzdrowski, K.L., et al. Preserved insulin secretion and insulin dependence in recipients of islet autografts. New England J.Med. 1992, 327, 220-226).

20 30 Cependant, malgré de nombreux progrès techniques, le rendement insuffisant et souvent aléatoire de l'isolement des îlots reste un frein majeur au développement de la thérapie cellulaire du diabète. Aujourd'hui la réunion des îlots provenant de plusieurs

5 donneurs reste le plus souvent nécessaire pour greffer une masse de tissu endocrine suffisante chez un patient diabétique et, étant donné le nombre limité de donneurs disponibles, l'utilisation actuelle des îlots de Langerhans humains primaires interdit néanmoins tout espoir de développement à grande échelle de la thérapie cellulaire de cette maladie.

10 Ainsi, des nouveaux procédés alternatifs d'obtention de cellules insulino-sécrétrices moins limités et utilisables chez l'homme ont été envisagés, tels que la manipulation génétique de cellules somatiques pour induire la synthèse d'insuline, l'immortalisation des lignées cellulaires ou encore l'utilisation de cellules animales. Cependant, des inconvénients subsistent, car d'une part la régulation transcriptionnelle coordonnée de la sécrétion d'insuline est complexe, et d'autre part l'utilisation clinique de cellules transformées d'origine animale est très controversée. Par conséquent, la conception des méthodes alternatives d'obtention de cellules insulino-sécrétrices demeure un enjeu majeur dans le cadre de la thérapie cellulaire du diabète.

25 Une autre approche tient compte des travaux expérimentaux récents qui ont mis en évidence dans le pancréas adulte, la présence des cellules souches pancréatiques, susceptibles de prolifération et de différenciation.

30 On connaît que le pancréas se forme au cours du développement embryonnaire à partir de l'endoderme (Le Douarin, N.M. " On the origin of pancreatic endocrine cells" . Cell, 1988, 53, 169-171) et que les trois types cellulaires pancréatiques existants dérivent de la

prolifération de l'épithélium pancréatique et de sa différenciation secondaire en tissu canalaire, endocrine ou acineux.

5 Bien que les mécanismes de différenciation entre les différents types cellulaires pancréatiques ne soient pas complètement élucidés, on connaît certains marqueurs phénotypiques spécifiques de chacun d'entre eux. Ainsi, chez le rongeur, comme chez l'homme, le phénotype des cellules souches pancréatiques est de type canalaire comme le démontre l'expression par celles-ci des cytokératines 20 et 19 (Bouwens L. et al. " Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas ". Diabetes. 1994, 43, 1279-1283 ; Bouwens L. et al. " Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas ". Diabetologia, 1997, 40, 398-404).

20 On connaît également le phénomène, appelé nésidioblastose, dont le mécanisme demeure inconnu, qui reproduit à l'âge adulte le mode de formation embryonnaire des cellules endocrines du pancréas. La nésidioblastose n'est pas un phénomène spécifique d'espèce, de plus on l'observe chez l'homme dans certaines circonstances pathologiques. La nésidioblastose est également fréquente dans le parenchyme adjacent des tumeurs endocrines du pancréas, qu'elles soient sporadiques ou provoquées par la mutation d'un gène suppresseur tumoral, dans des néoplasies endocriniennes . Dans certains cas exceptionnels on peut même observer une néosidioblastose diffuse de l'ensemble du pancréas.

30 Ces observations suggèrent donc la persistance dans le pancréas mature humain de cellules souches

quièsesentes présentant un phénotype canalaire et capables dans certaines conditions de différentiation endocrine.

5 Des procédés de culture in vitro de cellules de pancréas adulte qui tirent partie de ces observations et reproduisent ce phénomène de nésidioblastosis in vitro ont déjà été décrits. Par exemple, les demandes de brevet européen EP 758376 et EP 871455 décrivent un procédé d'obtention de cellules insulino-secrétrices à partir des préparations pancréatiques de tissu adulte, enrichies en cellules souche.

10 15 20 25 30 Cependant, le procédé d'obtention de cellules insulino-secrétrices décrit dans ces documents présente plusieurs inconvénients. D'une part, il inclut une première étape de culture destinée à enrichir la population cellulaire pancréatique, isolée lors de la première étape du procédé, en cellules souches. Cette étape, étalée sur plusieurs semaines, prévoit la culture des cellules pancréatiques dans un milieu pauvre en sérum de manière à éliminer 99% des cellules pancréatiques, dont la plupart sont des cellules différenciées exocrines. Le but étant de ne maintenir en culture qu'une population cellulaire enrichie en cellules souches précurseurs d'îlots. Après avoir effectuée cette sélection, la faible population de cellules souche isolées subit une étape d'expansion pendant plusieurs semaines. La troisième étape du procédé met en œuvre la différenciation des cellules souches en cellules insulino-sécrétrices. Un autre inconvénient majeur inhérent à ce procédé réside dans le faible nombre de cellules souches que l'on peut obtenir après avoir éliminé la quasi totalité (99%) des cellules pancréatique différenciées. Ce procédé d'obtention d'îlots endocrine in vitro chez le

mammifère adulte reproduit la voie d'embryogenèse pancréatique telle qu'elle s'effectue *in vivo*.

5 Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs sont parvenus à induire pour la première fois *in vitro* une transdifférenciation de cellules exocrines pancréatiques différenciées vers un autre phénotype différencié. Cette transdifférenciation n'est pas basée sur la voie physiologique empruntée par l'embryogenèse pancréatique *in vivo* et ouvre ainsi une voie alternative à 10 l'obtention de cellules pancréatiques différenciées.

De manière tout à fait surprenante, les inventeurs sont maintenant parvenus à induire *in vitro* une dédifférenciation des cellules exocrines du pancréas adulte, constituant plus de 95% du parenchyme pancréatique, sous certaines conditions de culture, pour obtenir des cellules dédifférenciées, ci-après appelées cellules précurseurs canalaire. 20

Ces cellules précurseurs canalaire, sont à leur tour cultivées dans un milieu adéquat, dans lequel on induit une rédifférenciation qui les transforme en cellules endocrines, insulino-sécrétrices. 25

Dans le cadre de la présente invention on entend par :

30 Différenciation : le fait pour une cellule d'acquérir une fonction spécialisée. Il s'agit du processus conduisant à l'expression de propriétés phénotypiques caractéristiques d'une cellule fonctionnellement mature *in vivo*.

Rédifférenciation : le fait pour une cellule de réacquérir une fonction spécialisée qu'elle a précédemment perdue, suite à une dédifférenciation.

Dédifférenciation ou retrodifférenciation: le fait pour une cellule spécialisée de régresser vers une forme embryonnaire moins spécialisée. La dédifférenciation comporte la perte, temporaire ou définitive, des caractéristiques génotypiques et/ou phénotypiques différencierées que ladite cellule spécialisée ait pu acquérir au cours de son développement. La dédifférenciation est soit un processus adaptatif impliquant que le phénotype différencié peut être atteint en administrant les inducteurs adéquats, ou bien sélectif, impliquant alors que les cellules précurseurs ont été choisies en raison de leur potentiel prolifératif plus élevé.

Transdifférentiation : Il s'agit d'un processus biologique de reprogrammation de l'expression génétique depuis un phénotype cellulaire vers un autre. La transdifférenciation comprend une première étape de dédifférenciation et une deuxième étape de rédifférenciation.

Cellule souche: Cellule ayant des capacités autoréplicatives illimitées, susceptible de produire au moins une descendance hautement différenciée de cellules unipotentes/bipotentes/multipotentes/pluripotentes/totipotentes.

Cellule dédifférenciée: toute cellule qui n'exprime ni le phénotype de la cellule originale ni celui des cellules subséquentes différenciées.

Cellule précurseur épithéliale: Cellule susceptible de se différencier, mais seulement pour devenir une cellule appartenant à son propre type tissulaire épithélial, et non à un autre. Les cellules précurseurs canalaires appartiennent à cette catégorie.

Cellule bêta : cellule des îlots de Langerhans du pancréas qui secrète l'hormone insuline en réponse au glucose et autre sécrétogogues.

5 Les inventeurs ont effectué d'importants travaux de recherche afin de prouver, tant au niveau moléculaire, comme au niveau protéique, que sous des conditions de culture adéquates, les cellules exocrines de pancréas se dédifférencient en cellules précurseurs, 10 portant un phénotype caractéristique des cellules épithéliales canalaires. La rédifférenciation postérieure, dans des conditions de culture adéquates, de ces cellules précurseurs exocrines permet la préparation, en grande quantité, des cellules insulino-sécrétrices. Lesdites cellules épithéliales canalaires re-exprimant le facteur IPF-1, un marqueur spécifique des cellules bêta insulino-sécrétrices.

20 Des manifestations *in vivo* de cette dédifférenciation cellulaire avaient déjà été observées *in vitro*, mais les inventeurs l'ont pour la première fois reproduit *in vitro* et l'ont utilisé dans le but d'obtenir une source abondante de cellules pancréatiques précurseurs endocrines. Le procédé qu'ils ont mis en œuvre ouvre la 25 voie à des innovations cliniques importantes dans le domaine du traitement thérapeutique de pathologies pancréatiques, notamment du diabète. Le nouveau procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices par transdifférenciation mis en œuvre dans le cadre de l'invention procure une source abondante de précurseurs de cellules bêta. Ceci permet d'envisager aisément d'une part une thérapie allogénique des pathologies pancréatiques, notamment du diabète et d'autre part, à une thérapie cellulaire autologue. En effet, une pancréatectomie 30

partielle permettra à partir d'un fragment réduit du pancréas du patient de produire, par le procédé de l'invention, des cellules insulino-sécrétrices autologues en quantité suffisante pour restaurer les fonctions pancréatiques.

10

La présente invention met en œuvre un procédé d'obtention *in vitro* de cellules insulino-sécrétrices partant d'une préparation de cellules pancréatiques de pancréas adulte, éventuellement dépourvu de cellules endocrines.

Le procédé d'obtention de cellules insulino-sécrétrices de l'invention est remarquable car il s'effectue précisément à partir de la population cellulaire exocrine qui compte pour plus de 95% des cellules présentes dans le tissu pancréatique et non à partir des seules cellules souches isolées.

5
20
10
15
25
30
35
40
45
50
55
60

Il est ainsi possible d'obtenir par cette voie jusqu'à 1,5 milliard de cellules précurseurs canalaires à partir d'un seul pancréas humain, soit 100 000 fois plus qu'à partir des canaux pancréatiques eux-mêmes.

25

Ainsi, l'invention se rapporte à un procédé d'obtention *in vitro* de cellules insulino-sécrétrices de mammifère, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

30

- a) la préparation des tissus pancréatiques de mammifère par prélèvement de pancréas ,
- b) la dissociation des tissus pancréatiques obtenus à l'étape (a) en cellules pancréatiques isolées,

c) éventuellement l'élimination de cellules endocrines des cellules pancréatiques isolées obtenues à l'étape (b),

d) l'induction de la dédifférenciation des cellules isolées à l'étape (c) en cellules précurseurs canalaires,

e) l'induction de la rédifférenciation des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (d) en cellules insulino-sécrétrices.

Selon un mode préféré de mise en œuvre du procédé de l'invention, la dissociation des tissus pancréatiques à l'étape (b) est effectuée au moyen d'une digestion enzymatique.

Avantageusement, les cellules pancréatiques isolées à l'étape (b) sont dépourvues de cellules endocrines avant l'étape (d) d'induction de la différenciation dans une étape (c).

Avantageusement l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques de l'étape (c) est effectuée au moyen d'une centrifugation en gradient de densité.

Préférentiellement, l'élimination des cellules endocrines des cellules pancréatiques à l'étape (c) est effectué par retrait de la fraction de cellules endocrines récupérée dans la gamme de densités comprise entre 1,027 g/l à 1,104 g/l, de préférence entre 1,045 g/l à 1,097 g/l.

Tout préférentiellement les cellules pancréatiques dépourvues de cellules endocrines obtenues à l'étape (c) sont des cellules exocrines récupérées dans le culot du gradient de densité.

5 Selon un autre mode de mise en œuvre du procédé de l'invention, l'élimination des cellules endocrines à l'étape (c) est effectuée au moyen d'un séparateur de cellules.

Avantageusement la dédifférenciation de l'étape (d) comprend les sous-étapes suivantes:

10 i) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (c) à une concentration cellulaire comprise entre 1×10^6 cellules/ml et 10×10^6 cellules/ml, de préférence entre 2×10^6 cellules/ml et 6×10^6 cellules/ml, dans un milieu de culture comprenant :

- du glucose à une concentration comprise entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2g/l et 5 g/l.

- éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 8%, de préférence comprises entre 10% et 15%, final en volume.

20 - un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentration comprise entre 0,2% et 3%, de préférence entre 1,0% et 2,5%,

25 - éventuellement des facteurs empêchant la croissance des fibroblastes à une concentration comprise entre 20 µg/ml et 100 µg/ml, de préférence entre 30 µg/ml et 60 µg/ml,

- éventuellement des antibiotiques, des antifongiques,

30 pendant une durée comprise entre 4 à 9 jours, de préférence de 5 à 7 jours,

ii) la récupération des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (i).

Avantageusement l'induction de la rédifférenciation de l'étape (e) comprend les sous-étapes suivantes:

5 i) éventuellement le décollement des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (d)

10 ii) la mise en culture des cellules précurseurs canalaires obtenues à l'étape (i) à des concentrations cellulaires comprises entre $3,5 \times 10^5$ cellules / 25cm^2 et 4×10^6 cellules/ 25cm^2 , de préférence de 7×10^5 cellules/ 25cm^2 à 3×10^6 cellules/ 25cm^2 , dans un milieu de culture comprenant:

15 - du glucose à des concentrations comprises entre 1g/l et 10 g/l, de préférence entre 2 g/l et 5 g/l.

20 - éventuellement du sérum, choisi parmi le sérum de veau fœtal, du sérum bovin ou du sérum humain, à des concentrations supérieures à 2,5%, de préférence comprises entre 5% et 15%, final en volume.

25 - éventuellement un mélange d'insuline, transferrine, sélénium utilisé à une concentration comprise entre 0,2% et 5 %, de préférence entre 0,5% et 2%,

30 - éventuellement des antibiotiques et des antifongiques,

35 - éventuellement en présence d'une matrice, pendant une durée comprise entre 12 heures et 36 heures,

40 iii) le retrait dudit milieu de culture, et des cellules non adhérentes éventuellement présentes,

45 iv) la mise en culture des cellules obtenues à l'étape (iii) dans un milieu de culture tel que celui utilisé à l'étape (i), comprenant éventuellement des facteurs de croissance,

50 pendant une durée comprise entre 4 et 12 jours, de préférence entre 5 et 10 jours,

55 pour obtenir des cellules endocrines insulino-sécrétrices, et

v) la récupération des cellules insulino-sécrétrices obtenues à l'étape (iv).

5 Selon une mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, le décollement des cellules à la sous-étape (i) de l'étape (e) est effectué avec de la trypsine/EDTA à des concentrations comprises entre 0,01% et 0,1% de trypsine, de préférence de 0,015 et 0,03 et d'EDTA comprises entre 0,1 mM et 1 mM de préférence de 0,25mM et 10 0,75 mM

20 Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention la matrice mis en œuvre pour la culture des cellules à la sous-tape (ii) de l'étape (e) est choisie parmi le collagène type IV, 804G, le collagène type I, le Matrigel ou ses équivalents connus de l'homme du métier.

25 Avantageusement, les tissus pancréatiques disséqués à l'étape (a) sont obtenus à partir du pancréas d'un adulte humain en état de mort cérébral.

20 De préférence, les tissus pancréatiques disséqués à l'étape (a) sont obtenus à partir d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'une pathologie pancréatique et tout préférentiellement à partir d'un fragment d'un pancréas d'un patient vivant atteint d'un diabète.

30 L'invention concerne également des cellules insulino-sécrétrices préparées par le procédé de l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation des cellules insulino-sécrétrices préparées par le procédé

de l'invention pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies pancréatiques humaines, et plus particulièrement destinée au traitement du diabète.

5

L'invention a également pour objet une méthode d'administration des cellules insulino-sécrétrices préparées selon le procédé de l'invention au moyen d'un cathéter intraportal percutané.

10

L'invention a également pour objet un pancréas bioartificiel constitué par les cellules insulino-sécrétrices préparées selon le procédé de l'invention cultivées après macroencapsulation selon des procédés connus en soi de l'homme du métier.

15
20
25
30

Les inventeurs ont effectué d'importants travaux de recherche visant à prouver qu'une population de cellules pancréatiques exocrines non-βeta 1 peut être effectivement obtenue *in vitro*, à partir du tissu pancréatique exocrine.

25

En premier lieu, la preuve de la dédifférenciation cellulaire *in vitro* des cellules exocrines pancréatiques, dans un milieu de culture adéquat a été apportée par vérification de la perte quasi complète d'expression d'amylase et une augmentation de l'expression de marqueurs canalaires (cytokératine 19, cytokératine 7, carbohydrate antigen 19-9).

30

Pour la première fois les travaux que les inventeurs ont effectués ont démontré une re-expression du facteur-1 promoteur de l'insuline (IPF-1) ou de ses équivalents: la séquence homéotique pancréatique duodénal

(PDX-1), la séquence homéotique d'îlot duodénal 1 (IDX-1), le facteur 1 de transactivation de la somatostatine (STF-1) par les cultures cellulaires pancréatiques au niveau protéique et ARNm.

5

Le facteur IPF-1 est une protéine homodomaine essentiellement présente dans les cellules bêta différenciées du pancréas adulte (Ohlsson H. et al. " IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene" ; The EMBO journal, 12 :4251-4259, 1993), fonctionnant comme regulator principal de phenotype b.

10

L'expression d'IPF-1/PDX-1 est conservée dans des cellules bêta humaines qui ont perdu leur capacité à exprimer de l'insuline, après une expansion de 30 000 fois.

0
5
10
15
20
25
30

Durant l'ontogénie pancréatique, l'expression du facteur IPF-1 au niveau des canaux primitifs apparaît comme essentielle pour la formation de cellules endocrines et exocrines chez la souris (Johnson J. et al. " Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice". Nature 371:606-609, 1994) et chez l'homme (Stoffers D.A. et al. " Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide, deletion in the human IPF1 gene coding sequence ". Nat.Genet. 15:106-110, 1997, son absence conduit à une agénésie pancréatique. Le facteur IPF-1 est également re-exprimé de manière significative dans les cellules canalaires en cours de prolifération durant la régénération pancréatique chez le rongeur adulte. Les auteurs ont récemment mis en évidence l'expression d'IPF-1 au sein des canaux humains adultes pancréatiques des patients avec une nésidioblastose. Par conséquent, le facteur IPF-1 s'avère être un marqueur des cellules canalaires qui récupèrent leur pluripotence pour se rédifférencier ultérieurement en

III

n'importe quel type cellulaire pancréatique (Sharma A. et al. " The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration ". *Diabetes* 48:507-513, 1999.

5 Etant donné que l'expression du facteur IPF-1 dans des cellules canalaires adultes semble être une condition préalable pour leur rédifférenciation en cellules bêta dans les modèles animaux, l'expression du facteur IPF-1 dans les cellules canalaires humaines en culture fournit une évidence de leur rédifférenciation potentielle et prouve que ces cellules sont des candidats précurseurs 10 endocrines.

15 La rédifférenciation postérieure, dans des conditions de culture adéquates, de ces cellules précurseurs endocrines permettront la préparation, en grande quantité, des cellules insulino-sécrétrices.

20 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples et des figures qui suivent rapportant le travail de recherche ayant permis de vérifier que dans les conditions de culture utilisées, on induit la dédifférenciation *in vitro* des cellules pancréatiques exocrines en cellules précurseurs canalaires. Ce sont ces cellules précurseurs canalaires qui 25 sont ensuite rédifférenciées en cellules endocrines, insulino-sécrétrices.

30 La figure 1 représente un schéma de l'embryogenèse pancréatique avec l'identification de l'origine des différents tissus pancréatiques et les marqueurs qui identifient les changements phénotypiques cellulaires mis en oeuvre dans le cadre de l'invention.

La figure 2 est un schéma du procédé de préparation de cellules insulino-sécrétrices mis en œuvre dans le cadre de l'invention.

5 La figure 3 illustre la transition phénotypique des cultures déterminée par une technique de slots blot.

La figure 4 montre l'expression de l'ARNm déterminée dans les préparations de cultures exocrines.

10

La figure 5 illustre l'analyse immunohistochimique, par Western Blot et les résultats PCR-RT des préparations exocrines avec l'immunomarquage spécifique des antigènes canalaires CK19, CK7.

15
20
25

Cellules précurseurs canalaires humaines.

Des cellules humaines présentant un phénotype de cellules précurseurs canalaires sont obtenues en culture à partir de préparations pancréatiques. Des pancréas humains ont été prélevés à partir de donneurs humains adultes en état de mort cérébrale. Les pancréas ont été éventuellement distendus avec 80 ml d'une solution froide de collagenase (0,5 mg/ml, Liberase® ou de la Collagenase de type P, Roche Diagnostics, Meylan, France), diluée dans du milieux Hanks.

25

30 Les pancréas sont dissociés selon la méthode automatisée de Ricordi (Ricordi, C. " Automated method for isolation of human pancreatic islets ". Diabetes 37 :413-420, 1988. avec quelques modifications (Kerr-Conte, J. et al. " Simple dithizone-stained multilayer test for selection of density gradient before human islet mass purification ". Transplant Proc. 26:4013-4015, 1994). Après la sélection des densités conduisant à une séparation

JEL

optimale, les îlots sont isolés par purification sur gradient discontinu de EuroFicoll® ou Histopaque® avec un séparateur de cellules COBE 2991.

5 La fraction exocrine est récupérée dans le culot, lavée trois fois dans de la solution de Hanks', et mise en culture, à raison de 2×10^6 cellules à 6×10^6 cellules par boîte de culture de 75 cm², dans du milieu de culture Dulbecco minimum essentiel (DMEM, avec 3g/l de glucose), contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS, Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France), 1% d'insuline, transferrine, sélénium (ITS,), et 50 µg/ml de Geneticine® (G418) afin de limiter la croissance de fibroblastes.

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
Après 12 heures d'attachement et tous les deux/trois jours, le milieu de culture est changé; les cultures monocouches sont maintenues pendant 2 semaines.

Prolifération cellulaire

Afin de vérifier la prolifération cellulaire, estimée dans les préparations exocrines, un µCi/ml de thymidine tritiée est ajouté au milieu de culture aux jours 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 et 10. Les cellules ainsi traitées ont été lavées, précipitées avec de l'acide trichloracétique 5%, soniquées et solubilisées dans de l'hydroxyde de sodium (0,5M) et comptées dans un compteur bêta après y avoir ajouté du liquide de scintillation. Le nombre de coups par minute (cpm) a été exprimé par rapport à l'ADN, mesuré avec le réactif PicoGreen®.

30

RNA

L'expression d'IPF-1, insuline, et bêta-actine ont été estimés par une réaction RT-PCR sur les préparations de cellules exocrines .

L'ARN total a été isolé avec du RNAzol® B et quantifié par spectrophotométrie (260 nm). L'ADNc a été synthétisé à partir de 2 µg d'ARN total avec des amorces oligo(DT)12-18 et une transcriptase inverse (M-MLV). La réaction PCR a été effectuée sur un aliquote d'un µl du produit de la réaction de RT en présence de 200 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, des amorces: 25 pM (IPF-1) ou 5pM (béta-actine) et 5U d'ADN polymérase AmpliTaq. Les jeux d'amorces incluent des amorces pour l'amplification de IPF-1 : 5'CCATGGATGAAGTCTACC-3', 5'-GTCCTCCTCCTTTCCAC-3' ; des amorces pour l'insuline : 5'-TGTGAACCAACACCTGTG-3', 5'-CGTCTAGTTGCAGTAGT-3' ; et des amorces pour la bêta-actine : 5'- ATCATGTTGAGACCTCCAA-3', 5'-CATCTCTGCTCGAAGTCCA-3'.

La réaction PCR est effectuée dans un appareil à PCR programmable avec 35 cycles pour l'IPF-1 (94°C : une minute / 52°C : une minute / 72°C : une minute) et avec 27 cycles pour l'insuline (94°C : 30 secondes / 53°C : 1 minute / 72°C : 30 secondes). Tous les produits PCR sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, Après digitalisation avec une caméra digital à intégration (CDD) (COHU 4912), les intensités des bandes, exprimées en Unités Arbitraires, sont quantifiées au moyen du logiciel GelAnalysts® version 3.01 FR (GreyStone-Iconix). L'expression de chaque produit spécifique est normalisée selon les niveaux du contrôle interne constitué par l'expression de bêta-actine.

Protéine

Une cinétique d'expression d'amylase, cytokératine 19, et IPF-1 a été effectuée sur les extraits protéiques des cultures.

Pour la réalisation des techniques de Slot et Western Blot, les cellules exocrines cultivées sont trypsinisées (0,025% trypsine-5mMEDTA) dans du tampon de Hank's exempt d'ions Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (Sigma-Aldrich) et lavées dans le milieu de culture. Les cellules sont homogénéisées dans de la glace dans un tampon salin phosphate-tamponné (PBS) supplémenté avec du glucose 0,25 M et lysées par ultrasonication. Les concentrations en protéine ont été mesurées avec le réactif acide bicinchinique. Pour les slots blots, les protéines totales (25 µg) ont été déposées sur des membranes de nitrocellulose en utilisant l'appareil de filtration Slot Blot Filtration manifolds (Amersham Life Science). Les membranes ont été saturées avec 5% de lait dans du PBS, incubées avec des anticorps dirigés contre l'amylase, la chromogranine A, le facteur IPF-1, la cytokératine CK19, dans du tampon de saturation dilué (1:10) durant deux heures. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS et incubées avec une solution contenant un anticorps secondaire marqué avec de la peroxydase de radis diluée 1/2000ème dans la solution de saturation diluée (1/10) pendant une heure. Après lavage dans du PBS, la liaison des anticorps est visualisé avec le réactif d'augmentation de la luminescence (Kit ECL®, Amersham). Les intensités des spots ont été quantifiées avec l'appareil Image quant 5.0 (Molecular Dynamics) et exprimées en Unités Arbitraires (Phosphoimager). Pour le Western blot, une quantité totale de 50 µg de protéine a été séparée par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant 10% de sodium dodécyl sulfate et transférée sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, Amersham). La saturation des membranes et la réaction d'immunochimioluminescence ont été effectuées comme décrit précédemment.

Immunohistochimie

L'immunohistochimie a été effectuée sur des cellules fixées dans de l'éthanol froid à 80% (-20°C, 10 minutes), avec des cytocentrifugeuses, fixées dans du 1% paraformaldéhyde (PFA) ou sur des sections en paraffine de tissu pancréatique fixé immédiatement après collecte dans de la formaline 10% ou du PFA.

Les anticorps (IPF-1, cytokératine 19 et 7 insuline, chromogranin A) sont révélés avec le système Envision® (Dako), en utilisant divers substrats chromogéniques, soit de la 3,3' diaminobenzidine (DAB) , soit du 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC), soit du Phtaloblue (Histomark Blue®). Les noyaux sont contrecolorés avec de l'hématoxyline de Carazzi.

Apoptosis

L'apoptose cellulaire spécifique des acini est évaluée après immunomarquage avec des anticorps anti-amylase visualisé avec un anticorps de chèvre biotinylé dirigé contre les anticorps de lapin (KPL, Gaithersburg, MD, USA) et de la streptavidine conjuguée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (streptavidine-FITC) (Sigma-Aldrich). Les altérations nucléaires apoptotiques sont visualisées avec du Hoescht 33258 -5 µg/ml 10 minutes, 37°C, Sigma-Aldrich).

Adhérence sélective des cellules Pour exclure que des cellules non acineuses adhèrent de façon préférentielle, les cellules positives à l'amylase par rapport au nombre total de cellules (noyaux) ont été dénombré dans les boîtes avant et après 12 heures de culture.

Le nombre de cellules acineuses dans la fraction en croissance est déterminé par un double marquage de cellules cytocentrifugées après 12 heures et deux jours de culture avec de l'amylase et du Ki-67 qui marque les cellules dans toutes les phases de leur cycle de croissance exceptées les cellules en phase G0.

Résultats

Les clusters cellulaires humain exocrins adhèrent après 12 heures de culture et s'étalent progressivement pour former des cultures monocouche. La prolifération cellulaire déterminée par l'incorporation de thymidine tritiée (³H) augmente rapidement, avec un pic après trois jours et seulement après une diminution lente de l'expansion. L'incorporation de thymidine (³H) exprimée en cpm/μg ADN x 103 !SEM (n=3) est: 40,5~~8~~!8,7 (jour 1), 79,3~~24~~24,2 (jour 1,5), 83,7~~12~~12,8 (jour 2), 95,4~~5~~5,4 (jour 3), 82,1~~5~~5,0 (jour 4), 42,9~~21~~21,5 (jour 6) et 68,5~~5~~5,1 (jour 10).

Les taux d'ADN et de protéine corrèlent avec les taux de prolifération avec la thymidine tritiée. La figure 3 illustre la transition phénotypique des cultures déterminée par les slots blots utilisant 25 μg de protéines totales issues des cultures. Les protéines sont exprimées en Unités Arbitraires d'intégration. Cette figure 3 illustre le chargement effectif en protéines confirmé dans (n=3) les préparations en mesurant les taux de béta-actine entre les puits; il n'y a pas de différences statistiques tout au long de la culture. Cette figure représente les analyses par Slot Blots sur 25 μg de protéine totale. Les niveaux de béta-actine ont été mesurés à partir de 3 préparations comme standard interne, contrôlant la quantité de protéine chargée par puits.

La figure 3A où le phénotype exocrine est révélé avec l'anti-amylase (■), le phénotype canalaire avec l'anti-CK19 (□), le phénotype endocrine avec l'anti-chromogranine A (○), illustre les taux élevés de protéine amylase exprimées par les préparations exocrines après leur isolement, alors que les taux des protéines canalaires (CK19) et endocrine (chromogranine A) sont inférieurs. Une réduction importante de la protéine amylase est observée après un jour de culture, ($92 \pm 3,3$, $p<0,05$ versus le jour 1). La figure 3B avec l'anti-IPF1 (moyenne \pm ESM, $P<0,05$ v.s. jour 0), où l'intensité des spots est exprimée en unité arbitraire après intégration numérique illustre des slots blots qui prouvent que la protéine IPF-1 est présente à des taux infimes dans les préparations exocrines après l'isolement augmentent durant leur culture, et restent élevées. La figure 3C montre les Western blots représentatifs de cinq pancréas humains, révèle que la bande de 46 Kilodalton caractéristique de la protéine IPF-1 est faible ou indétectable immédiatement après l'isolement des cellules exocrines (jour 0) et s'intensifie au fur et à mesure de leur culture. Les résultats de Western blot sont confirmés avec deux anticorps anti-IPF-1 différents dirigés contre les domaines C-terminal et N-terminal. La figure 3D illustre l'étude cinétique obtenue en utilisant une visualisation plus sensible avec la trousse ECL plus et un analyseur d'images Phosphoimager®, soulignant que cette augmentation en protéine IPF-1 (3,2 fois) se manifeste rapidement dans les deux premiers jours de culture.

La figure 4 montre l'expression de l'ARNm déterminée dans les préparations de cultures exocrines ($n=5$), normalisées pour l'expression de bêta-actine

La figure 4A illustre les produits de PCR avec les bandes spécifiques de l'IPF-1 (262 pb) et de la béta-actine (314 pb).

La figure 4B illustre que l'expression moyenne d'IPF-1/béta-actine est faible avant la culture et que celle-ci augmente rapidement de 10,5 fois après 3 jours (n=5, p<0,001) par rapport au jour 1 et reste élevée, avec des taux d'expression huit fois supérieur, au bout d'une semaine et sept fois supérieur au bout de deux semaines en comparaison au jour 1 (9=0,08 versus jour 1 ; p<0,001 versus jour 0).

La figure 4C où (O) représente l'expression de l'insuline normalisée par rapport à la béta-actine (n=5 ; P>0,05 comparé au jour 0) et (■) représente l'expression de l'insuline à partir de préparations endocrines purifiées (n=5), illustre la détermination de l'ARNm de l'insuline dans les préparations exocrines afin de contrôler la contamination avec des population de cellules endocrines durant la culture (des îlots (n=4, 71 ± 6% purs) sont utilisés en tant que contrôle positif). Les taux d'ARNm dans les cultures exocrine demeurent inférieurs (par exemple entre 7% (jour 0) et 2,5% (jours 3, 7) à ceux des îlots contrôle. Il n'a pas été observé des différences significatives entre les taux des jours J0, J3 ni J7.

La figure 5 illustre l'analyse immunohistochimique, complémentaire du Slot blot, du Western Blot et des résultats PCR-RT montrant que la culture des préparations exocrines durant une semaine conduit à la perte de l'immunomarquage spécifique de l'amylase (non montré), et à une augmentation du marquage des antigènes canalaires CK19, CK7.

La figure 5A illustre qu'après 7 jours de culture, les cellules montrent un phénotype canalaire

révélé avec un marquage dominant pour l'expression du CK19. Le marquage de l'insuline est toujours négatif dans les préparations exocrine cultivées, par conséquent, le marqueur neuroendocrine Chromogranine A a été employé pour évaluer la contamination des préparations exocrines avec des îlots. La figure 5B (flèche) illustre que la contamination avec des cellules endocrines est limitée et demeure inférieur à 5%, à la fois dans les préparations initiales ainsi qu'au terme de la culture. Un double immunomarquage a été effectué pour établir que la plupart de cellules dans les cultures dérivés des préparations exocrines sont des cellules canalaires (cellules CK19/CK7 positives) et IPF-1 positives soit dans le compartiment cytoplasmique, soit dans le compartiment nucléaire (CK 7/IPF-1, illustrées Figure 5C). Les rares cellules IPF-1 positives et CK 7 négatives (tête de flèche) correspondent vraisemblablement à des cellules bêta contaminantes.

Afin d'exclure une adhérence sélective du tissu exocrine, les inventeurs ont comparé les préparations immunomarquées avec de l'amylase /Hoescht avant le jour J0 et 12 heures après leur mise en culture.

Environ 60% (n=2, 59%±1 en triple) de la totalité des cellules présentent une coloration à l'amylase au jour J0 (donc 41% non acineuses) et ce pourcentage demeure identique après 12 heures de culture.

L'apoptose est surveillé par immunomarquée avec un anticorps anti-amylase/Hoescht 33258 (n=2)

Les signes nucléaires d'apoptose ont été virtuellement absente des cultures exocrines, en particulier durant le changement principal phénotypique (Jour 3). Au jour 5, un petit nombre de cellules en culture

présentent des noyaux en forme de demi-lune, indicateurs d'un processus d'apoptose, cependant ils demeurent négatifs pour la coloration avec l'annexine V, un marqueur précoce de l'apoptose

5 Inversement, un double immunomarquage des préparations après 12 heures et après deux jours (n=2) pour l'amylase et Ki-67, un antigène nucléaire exprimé durant toutes les phases du cycle cellulaire excepté G0, montre que la plupart de cellules acineuses forment partie de la fraction en croissance. Au bout d'environ 12 heures de culture, 40% de la totalité des cellules sont des cellules acineuses dans le cycle cellulaire (Amy+/Ki-67+), 15% sont des cellules acineuses qui ne sont pas en cycle (Amy+/Ki-67-), 43% des cellules sont des cellules non-acineuses en cycle (Amy-/Ki-67+), ainsi, seulement 17% des cellules sont en phase G0 du cycle cellulaire et sont par conséquent Ki-67 négatives. Après deux jours de culture, lorsque l'expression de l'amylase est encore visible par des techniques immunohistochimiques et les niveaux de prolifération (thymidine tritiée) sont proches des pics, 51,5% des cellules sont des cellules acineuses (Amy+/ki-67-), 42% des cellules sont de cellules non-acineuses en cycle (Amy-/Ki-67+).

20

25

30

Le rôle du facteur de transcription IPF-1 dans la néogénèse des îlots est supporté par son expression accrue dans les canaux pancréatiques, le site des précurseurs cellulaires endocrines, dans plusieurs modèles de régénération pancréatique. L'expression du facteur IPF-1 dans des cellules canalaires récemment divisées appuie l'hypothèse que toutes les cellules canalaires adultes peuvent récupérer leur pluripotence (par exemple leur capacité de cellules souches), (Bonner-Weir S. et al. "Partial pancreatectomy as a model of pancreatic regeneration" In Pancreatic Growth and Regeneration.

Sarvetnick N. Ed. Paris, Karger Landes Systems, 1997, p.138-153).

Le rôle décisif du facteur IPF-1/PDX-1 dans la différenciation cellulaire endocrine de cellules endodermiales digestives a été récemment confirmé dans le foie (Ferber S et al. Pancreatic duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin induced hyperglycemia Nature Med 6: 568-572, 2000).

10

La transition des préparations cellulaires exocrines en culture vers un phénotype canalaire a été bien caractérisé dans diverses espèces, mais le mécanisme exact qui y est impliqué demeure controversé. La ligation du canal de rat est suivie d'une délétion apoptotique des cellules acineuses simultanément à une prolifération de cellules canalaires. Logsdon et al., travaillant sur des cellules acineuses de souris ont également montré une perte substantielle de tissu exocrine (ADN, protéines) précédant la prolifération cellulaire.

0
15
20
25

Inversement, lors des expériences menées par les inventeurs dans le cadre de la présente invention, les augmentations rapides de la prolifération cellulaire, des taux d'ADN et de protéine observées immédiatement après l'attachement cellulaire (12 heures) sont corrélées avec l'augmentation initiale des marqueurs cellulaires canalaires et avec la chute des niveaux d'amylase.

30

Un attachement sélectif des cellules canalaires et la mort et/ou apoptose des cellules acineuses ne peut pas expliquer ces faits dans le modèle humain car la proportion de cellules amylase positives initialement présentes dans les préparations demeure identique après 12

.

heures de culture lorsque les plaques sont lavées des cellules non attachées. Alternativement, cette perte rapide de l'amylase peut être due à une diminution des taux d'amylase dans les cellules acineuses.

5

Aucune des méthodes utilisées pour évaluer l'apoptose, incluant des marqueurs précoces et tardifs, ne détecte des niveaux croissants d'apoptose durant la transition phénotypique (jour 3).

10

Par contre, la présence précoce de cellules Ki-67/amylase positives dans les cultures invoque leur prolifération potentielle et confirme que la transition phénotypique advient avec la prolifération cellulaire telle qu'il a été démontré sur d'autres modèles.

0
15
20
25
30
P

L'apparition d'un petit nombre de nuclei avec une forme de demi-lune est observée seulement après 5 jours de culture, après la transition phénotypique principal. L'absence d'une apoptose significative dans ces cultures et la présence de taux élevés de prolifération prouve que les cellules acineuses se sont dédifférenciées en cellules ayant un phénotype canalaire, simultanément avec la croissance rapide des cellules CK19 positive pré-existantes.

25

Ces cellules canalaire dérivées des populations exocrines expriment des taux faibles ou inexistantes de protéine IPF-1 ainsi que des taux faibles d'ARNm d'IPF-1 qui s'accroissent rapidement durant la culture. La bande de 46 kD, caractéristique d'IPF-1 est confirmée par deux anticorps anti-IPF afin d'exclure la détection, par ces techniques sensibles, d'IPF-1 dérivés des fractions minimes de cellules endocrines contaminantes.

11

des quantifications simultanées de l'ARNm de l'insuline ont été effectuées. Les niveaux de cet ARNm d'insuline sont initialement détectables dans les préparations lorsqu'ils sont comparés avec les niveaux trouvés pour les îlots, et demeurent pratiquement constants durant toute la période de culture.

L'immunohistochimie avec deux anticorps anti-IPF-1 localise l'expression d'IPF-1 sur les cellules canalaires (CK-7 positives). Seulement quelques cellules endocrines sont présentes (Figure 5). En utilisant des marqueurs pan-neuroendocrins incluant la Chromogranine A et la Synaptophysine, le nombre total de cellules endocrines dans la préparation initiale est estimé à 4,7!1,8% de la préparation initiale et 3,5!0,8% des cellules après 7 jours de culture (résultats non montrés).

La discordance entre cette faible (<5%) contamination endocrine des cultures exocrines, et l'intensité de l'immunomarquage IPF-1 et CK 19 (CK 7) contribuent à confirmer que le facteur IPF-1 ne provient pas essentiellement des cellules bêta contaminantes CK19 négatives. Les études de double marquage avec IPF-1 et Synaptophysine (non montrés) confirment ces données.

Les Westerns blots effectués avec des extraits de protéines totales isolées d'îlots humains purifiés montrent les deux formes de protéines avec la visualisation des deux bandes à 31 kD et 46 kD (données non montrées), révélées avec l'anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de PDX-1. Les extraits de protéine à partir de préparations de cultures de cellules exocrines humaines montrent une bande principale à 46 kD et une bande cytoplasmique à 31 kD faible ou indétectable.

A différence des cellules IPF-1 positives mais CK 19 négatives montrées par Beattie et al. qui sont d'origine endocrine, la plupart de cellules dans les cultures dérivées des cellules exocrines manifestent un phénotype canalaire (positive pour CK 19, CK 7 et carbohydrate 19-9 (résultats non montrés) et sont simultanément IPF-1 positives. Les cultures initiales montrées par Beattie et al. étaient insuline et IPF-1 positives, très différentes de celles décrites dans les expériences menées dans le cadre de la présente invention, impliquant que les cellules IPF-1 positives de leur étude sont des cellules bêta dédifférenciées.

Ainsi, les inventeurs montrent que la dédifférenciation/transdifférenciation rapide de cellules exocrines *in vitro* est associée simultanément à l'augmentation des marqueurs canalaire et à la transcription du facteur IPF-1 tant au niveau de l'ARNm comme au niveau de la protéine.